

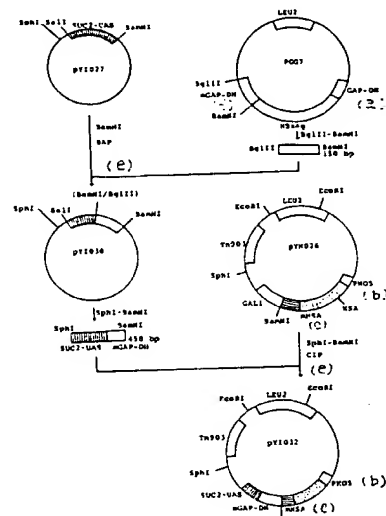
(54) HYBRID PROMOTER

- (11) 3-155791 (A) (43) 3.7.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-295818 (22) 14.11.1989
 (71) GREEN CROSS CORP:THE (72) YUTAKA ISHIDA(4)
 (51) Int. Cl.⁵. C12N15/81, C12N15/14, C12P21/02, (C12P21/02, C12R1/865)

NEW MATERIAL: A hybrid promoter having a structure prepared by coupling a fragment containing an UAS of SUS2 promoter to a fragment containing TATA box site of GAP-DH promoter.

USE: Used for production of human serum albumin(HSA) by the recombinant DNA technique.

PREPARATION: For example, a SUS2 promoter-containing plasmid PY1011 is prepared from SUS2 gene and the resultant plasmid PY1011 is ligated to plasmid pUC18 to obtain plasmid pY1027. The obtained plasmid pY1027 is then coupled to a fragment prepared by digestion of plasmid PGG7 containing TATA box site of GAP-DH promoter using BglII-BamHI restriction enzyme and, furthermore, ligated to a fragment prepared by digestion of plasmid pYN026 using SphI-BamHI restriction enzyme, thus obtaining the objective hybrid promoter.



(a): GAP-DH terminator. (b): PHO5 terminator. (c): mHSA signal. (d): mGAP-DH promoter. (e): ligation

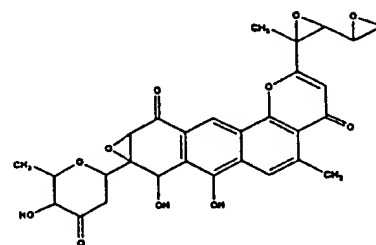
(54) NOVEL SUBSTANCE DC114-C

- (11) 3-155793 (A) (43) 3.7.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-294290 (22) 13.11.1989
 (71) KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD (72) HIROFUMI NAKANO(5)
 (51) Int. Cl.⁵. C12P17/16, C07D493/04

NEW MATERIAL: A compound of the formula. The compound has the following physicochemical properties. Mol.wt.: 550; molecular formula: C₂₉H₂₆O₁₁; mass spectrometry: SIMS 551 (M+1)⁺; specific rotation [α]_D²⁵ = -66°C (c=0.11, acetone); solubility: soluble in chloroform, dimethyl sulfoxide, methanol, ethyl acetate and acetone; slightly soluble in water and n-hexane; coloring reaction: positive for an iodo reagent; a brown acidic substance, etc.

USE: An antimicrobial or antitumor agent.

PREPARATION: A DC114-C-producing bacterium strain [e.g.; Streptomyces-SP-00-114 (FERM BP-2641)] belonging to the Streptomyces genus is cultured.

**(54) MOUSE-INTERLEUKIN-6 RECEPTOR PROTEIN**

- (11) 3-155795 (A) (43) 3.7.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-292230 (22) 13.11.1989
 (71) CHUZO KISHIMOTO (72) CHUZO KISHIMOTO
 (51) Int. Cl.⁵. C12P21/02, C07K13/00, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/12, A61K37/02 (C12P21/02, C12R1/19)

NEW MATERIAL: Mouse-interleukin-6 receptor protein capable of specifically combining with mouse-interleukin-6.

EXAMPLE: Mouse-interleukin-6 receptor protein having an amino acid sequence of the formula.

USE: A therapeutic drug, diagnostic drug, etc., for immuno-deficient diseases.

PREPARATION: A DNA sequence coding the mouse-interleukin-6 receptor protein is manifested in a microorganism or cultured cell to produce the mouse-interleukin-6 receptor protein, the microorganism or cultured cell being transformed with a duplicable manifestation vector capable of manifesting the DNA sequence coding the mouse-interleukin-6 receptor protein in the recombinant microorganism or cultured cell.

Met Leu Thr Val Gly Cys Thr Leu Leu Val
 Ala Leu Leu Ala Ala Pro Ala Val Ala Leu
 Val Leu Gly Ser Cys Arg Ala Leu Glu Val
 Ala Asn Gly Thr Val Thr Ser Leu Pro Gly
 Ala Thr Val Thr Leu Ile Cys Pro Gly Lys
 Glu Ala Ala Gly Asn Val Thr Ile His Trp
 Val Tyr Ser Gly Ser Gln Asn Arg Glu Trp
 Gly Ser Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Cys
 Val Phe Ile Ile Leu Arg Leu Lys Gln Lys
 Trp Lys Ser Glu Ala Glu Lys Glu Ser Lys
 Thr Thr Ser Pro Pro Pro Pro Tyr Ser
 Leu Gly Pro Leu Lys Pro Thr Phe Leu Leu
 Val Pro Leu Leu Thr Pro His Ser Ser Gly
 Ser Asp Asn Thr Val Asn His Ser Cys Leu
 Gly Val Arg Asp Ala Gln Ser Pro Tyr Asp
 Asn Ser Asn Arg Asp Tyr Leu Phe Pro Arg

⑫ 公開特許公報(A) 平3-155795

⑤ Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成3年(1991)7月3日

C 12 P 21/02

C 07 K 13/00

C 12 N 1/21

5/10

15/12

// A 61 K 37/02

(C 12 P 21/02

C 12 R 1:19)

ZNA

C

8214-4B

8619-4H

6807-4B

ABB

8615-4C

8717-4B

6807-4B

C 12 N 15/00

5/00

A

B

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全10頁)

⑥ 発明の名称 マウス・インターロイキン-6レセプター蛋白質

⑦ 特 願 平1-292230

⑧ 出 願 平1(1989)11月13日

特許法第30条第1項適用 平成1年10月20日、日本免疫学会発行の「日本免疫学会記録第19巻」に発表

⑨ 発 明 者 岸 本 忠 三 大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

⑩ 出 願 人 岸 本 忠 三 大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

⑪ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

明 細 書

1. 発明の名称

マウス・インターロイキン-6レセプター
蛋白質

2. 特許請求の範囲

1. マウス・インターロイキン-6 (以下IL-6という。)と特異的に結合しうるマウス・インターロイキン-6レセプター蛋白質。

2. 下記の式(I):

(N末端)

Met Leu Thr Val Gly Cys Thr Leu Leu Val
Ala Leu Leu Ala Ala Pro Ala Val Ala Leu
Val Leu Gly Ser Cys Arg Ala Leu Glu Val
Ala Asn Gly Thr Val Thr Ser Leu Pro Gly
Ala Thr Val Thr Leu Ile Cys Pro Gly Lys
Glu Ala Ala Gly Asn Val Thr Ile His Trp
Val Tyr Ser Gly Ser Gln Asn Arg Glu Trp
Thr Thr Thr Gly Asn Thr Leu Val Leu Arg
Asp Val Gln Leu Ser Asp Thr Gly Asp Tyr
Leu Cys Ser Leu Asn Asp His Leu Val GlyThr Val Pro Leu Leu Val Asp Val Pro Pro
Glu Glu Pro Lys Leu Ser Cys Phe Arg Lys
Asn Pro Leu Val Asn Ala Ile Cys Glu Trp
Arg Pro Ser Ser Thr Pro Ser Pro Thr Thr
Lys Ala Val Leu Phe Ala Lys Lys Ile Asn
Thr Thr Asn Gly Lys Ser Asp Phe Gln Val
Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Gln Leu Lys Ser
Phe Ser Cys Gln Val Glu Ile Leu Glu Gly
Asp Lys Val Tyr His Ile Val Ser Leu Cys
Val Ala Asn Ser Val Gly Ser Lys Ser Ser
His Asn Glu Ala Phe His Ser Leu Lys Met
Val Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Leu Val
Val Ser Ala Ile Pro Gly Arg Pro Arg Trp
Leu Lys Val Ser Trp Gln His Pro Glu Thr
Trp Asp Pro Ser Tyr Tyr Leu Leu Gln Phe
Gln Leu Arg Tyr Arg Pro Val Trp Ser Lys
Glu Phe Thr Val Leu Leu Leu Pro Val Ala
Gln Tyr Gln Cys Val Ile His Asp Ala Leu
Arg Gly Val Lys His Val Val Gln Val Arg
Gly Lys Glu Glu Leu Asp Leu Gly Gln Trp

Ser Glu Trp Ser Pro Glu Val Thr Gly Thr
 Pro Trp Ile Ala Glu Pro Arg Thr Thr Pro
 Ala Gly Ile Leu Trp Asn Pro Thr Gln Val
 Ser Val Glu Asp Ser Ala Asn His Glu Asp
 Gln Tyr Glu Ser Ser Thr Glu Ala Thr Ser
 Val Leu Ala Pro Val Gln Glu Ser Ser Ser
 Met Ser Leu Pro Thr Phe Leu Val Ala Gly
 Gly Ser Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Cys
 Val Phe Ile Ile Leu Arg Leu Lys Gln Lys
 Trp Lys Ser Glu Ala Glu Lys Glu Ser Lys
 Thr Thr Ser Pro Pro Pro Pro Tyr Ser
 Leu Gly Pro Leu Lys Pro Thr Phe Leu Leu
 Val Pro Leu Leu Thr Pro His Ser Ser Gly
 Ser Asp Asn Thr Val Asn His Ser Cys Leu
 Gly Val Arg Asp Ala Gln Ser Pro Tyr Asp
 Asn Ser Asn Arg Asp Tyr Leu Phe Pro Arg

(C末端)

(ただし、式中Ala はアラニン、Arg はアルギニン、Asn はアスパラギン、Asp はアスパラギン酸、Cys はシステイン、Gln はグルタミン、Glu はグ

ルタミン酸、Gly はグリシン、His はヒスチジン、Ile はイソロイシン、Leu はロイシン、Lys はリジン、Met はメチオニン、Phe はフェニルアラニン、Pro はプロリン、Ser はセリン、Thr はトレオニン、Trp はトリプトファン、Tyr はチロシン、そしてVal はバリン残基を示す。)で表されるアミノ酸配列を有するか、あるいはこのアミノ酸配列中の1個または複数のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基により置換されているかまたは欠失もしくは付加されているアミノ酸配列を有し、かつマウスIL-6と特異的に結合する能力を保持していることを特徴とする請求項1に記載のマウスIL-6レセプター蛋白質。

3. マウスIL-6レセプター蛋白質をコードするDNA。

4. 請求項2に記載のいずれかのアミノ酸配列を有するマウスIL-6レセプター蛋白質をコードするDNA。

5. 下記の式(Ⅱ)：

(5-)

ATG CTG ACC GTC GGC TGC ACG CTG TTG GTC
 GCC CTG CTG GCC GCG CCC GCG GTC GCG CTG
 GTC CTC GGG AGC TGC CGC GCG CTG GAG GTG
 GCA AAT GGC ACA GTG ACA AGC CTG CCA GGG
 GCC ACC GTT ACC CTG ATT TGC CCC GGG AAG
 GAA GCA GCA GGC AAT GTT ACC ATT CAC TGG
 GTG TAC TCT GGC TCA CAA AAC AGA GAA TGG
 ACT ACC ACA GGA AAC ACA CTG GTT CTG AGG
 GAC GTG CAG CTC AGC GAC ACT GGG GAC TAT
 TTA TGC TCC CTG AAT GAT CAC CTG GTG GGG
 ACT GTG CCC TTG CTG GTG GAT GTT CCC CCA
 GAG GAG CCC AAG CTC TCC TGC TTC CGG AAG
 AAC CCC CTT GTC AAC GCC ATC TGT GAG TGG
 CGT CCG AGC AGC ACC CCC TCT CCA ACC ACG
 AAG GCT GTG CTG TTT GCA AAG AAA ATC AAC
 ACC ACC AAC GGG AAG AGT GAC TTC CAG GTG
 CCC TGC CAG TAT TCT CAG CAG CTG AAA AGC
 TTC TCC TGC CAG GTG GAG ATC CTG GAG GGT

GAC AAA GTA TAC CAC ATA GTG TCA CTG TGC
 GTT GCA AAC AGT GTG GGA AGC AAG TCC AGC
 CAC AAC GAA GCG TTT CAC AGC TTA AAA ATG
 GTG CAG CCG GAT CCA CCT GCC AAC CTT GTG
 GTA TCA GCC ATA CCT GGA AGG CCG CGC TGG
 CTC AAA GTC AGC TGG CAG CAC CCT GAG ACC
 TGG GAC CCG AGT TAC TAC TTG CTG CAG TTC
 CAG CTT CGA TAC CGA CCT GTA TGG TCA AAG
 GAG TTC ACG GTG TTG CTG CTC CCG GTG GCC
 CAG TAC CAA TGC GTC ATC CAT GAT GCC TTG
 CGA GGA GTG AAG CAC GTG GTC CAG GTC CGT
 GGG AAG GAG GAG CTT GAC CTT GGC CAG TGG
 AGT GAA TGG TCC CCA GAG GTC ACG GGC ACT
 CCT TGG ATA GCA GAG CCC AGG ACC ACC CCG
 GCA GGA ATC CTC TGG AAC CCC ACA CAG GTC
 TCT GTT GAA GAC TCT GCC AAC CAC GAG GAT
 CAG TAC GAA AGT TCT ACA GAA GCA ACG AGT
 GTC CTC GCC CCA GTG CAA GAA TCC TCG TCC
 ATG TCC CTG CCC ACA TTC CTG GTA GCT GGA
 GGA AGC TTG GCG TTT GGG TTG CTT CTC TGT

GTC TTC ATC ATC CTG AGA CTC AAG CAG AAA
 TGG AAG TCA GAG GCT GAG AAG GAA AGC AAG
 ACG ACC TCT CCT CCA CCC CCA CCG TAT TCC
 TTG GGC CCA CTG AAG CCG ACC TTC CTT CTG
 GTT CCT CTC CTC ACC CCA CAC AGC TCT GGG
 TCT GAC AAT ACC GTA AAC CAC AGC TGC CTG
 GGT GTC AGG GAC GCA CAG AGC CCT TAT GAC
 AAC AGC AAC AGA GAC TAC TTA TTC CCC AGA

(3-)

(ただしAはアデニン、Gはグアニン、Cはシ
 トシン、Tはチミンを有するヌクレオシドを示す)
 で表される請求項3に記載のDNA。

6. 前記DNAを発現させるDNA配列と読
 取り可能に結合していることを特徴とする請求項
 3に記載のDNA。

7. 組換え微生物または培養細胞中で請求項3に
 記載のDNA配列を発現しうる複製可能な発現ベ
 クター。

8. 請求項7に記載の発現ベクターにより形質
 転換された微生物または培養細胞においてマウス

IL-6レセプター蛋白質をコードするDNA配
 列を発現させ、該蛋白質を生産させることを特徴
 とするマウスIL-6レセプター蛋白質の生産方
 法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はマウスIL-6レセプター蛋白質およ
 び該蛋白質をコードするDNA、さらには該蛋白
 質を遺伝子工学的に生産するための手段および方
 法に関するものである。

〔従来技術〕

IL-6は、免疫、造血、炎症という生体防御
 系において重要な役割を果たしていることを特徴
 とする、生体の増殖分化に広く関与するタンパク
 質である。一方、IL-6の異常産生が種々の自
 己免疫疾患の病因因子である可能性が報告されて
 いる(岸本、平野、Ann. Rev. Immunol., 6, p485,
 1988年参照)。

IL-6のシグナル伝達経路は、以下のように

解明されてきた。まずIL-6と特異的に結合す
 る細胞膜上のIL-6レセプターが、田賀らによ
 り解析され、各細胞上の数、IL-6との結合定
 数が報告された(J. Exp. Med., 196, p967, 1987
 年参照)。次にヒトIL-6レセプターのcDNAが
 山崎らにより単離され、1次構造が決定された
 (Science, 241, p825, 1988年参照)。さらに
 IL-6のシグナル伝達に関与する細胞膜上の別
 の蛋白質が田賀らにより発見された(Cell, 58,
 p573, 1989年参照)。

生体内で多様な生理活性を強く発揮するIL-
 6の作用を人為的に調節することは、各種疾患の
 新しい治療のメカニズムとして期待されている。
 例えば、IL-6の骨髓細胞増殖効果や血小板増
 加効果は放射線等の癌治療の効果を高める。一方、
 各種自己免疫疾患では、その病因と考えられる
 IL-6作用の抑制が、症状の軽減につながる。
 前者の目的には、遺伝子工学的に作成されたヒト
 IL-6が、後者の目的には、遺伝子工学的に作
 成された細胞表面より離脱した(可溶性)ヒト

IL-6レセプターやヒトIL-6に対する中和
 抗体が考えられるが、さらに他の合成物質や天然
 物質にもIL-6の作用を調節する物質の存在が
 期待される。

可溶性ヒトIL-6レセプターをIL-6作用
 を調節する薬剤として開発するためには、マウス
 等の実験動物に投与して、その効果を調べるこ
 とが必須となる。しかし、ヒト可溶性IL-6レセ
 プターをマウス等の実験動物に投与しても、実験
 動物由来のIL-6と特異的に結合することが期
 待できない。さらには、ヒト可溶性IL-6レセ
 プターの実験動物に対する抗原性も問題となる。
 実験動物の中では、マウスが、取り扱いの容易さ
 において、さらにはIL-6過剰産生により自己
 免疫疾患になるストレインが確立されているとい
 う点において、最もその使用が望まれる。しかし、
 マウス可溶性IL-6レセプターを遺伝子工学的
 に生産するには、マウスIL-6レセプターをコ
 ードするDNA配列が必須である。

〔発明が解決しようとする課題〕

従って、本発明はマウス IL-6 レセプター及びそれをコードする DNA 並びに該 DNA を用いる該レセプターの製造方法を提供しようとするものである。

〔課題を解決するための手段〕

上記の目的を達成するために、本発明者は、IL-6 レセプターについて鋭意研究を行った結果、マウス IL-6 レセプターをコードする DNA 配列を明らかにし、この知見をもとに遺伝子工学的に IL-6 レセプターを生産する手段および方法を完成した。

すなわち本発明は、マウス IL-6 と特異的に結合するマウス IL-6 レセプター；マウス IL-6 レセプターをコードする DNA 配列；組換え微生物または培養細胞中で前記 DNA 配列を発現し得る複製可能な発現ベクター；前記発現ベクターにより形質転換された微生物または培養細胞；および前記微生物または培養細胞においてマウス

IL-6 レセプターをコードする DNA 配列を発現させることを特徴とするマウス IL-6 レセプターの生産方法、を提供するものであり、以下詳細に説明する。

〔発明の具体的な説明〕

1. マウス IL-6 レセプター

マウス IL-6 レセプターは、マウス由来の細胞膜上に存在し、マウス IL-6 と特異的に結合するタンパク質である。詳しくは次の式 (I)

Met Leu Thr Val Gly Cys Thr Leu Leu Val
Ala Leu Leu Ala Ala Pro Ala Val Ala Leu
Val Leu Gly Ser Cys Arg Ala Leu Glu Val
Ala Asn Gly Thr Val Thr Ser Leu Pro Gly
Ala Thr Val Thr Leu Ile Cys Pro Gly Lys
Glu Ala Ala Gly Asn Val Thr Ile His Trp
Val Tyr Ser Gly Ser Gln Asn Arg Glu Trp
Thr Thr Thr Gly Asn Thr Leu Val Leu Arg
Asp Val Gln Leu Ser Asp Thr Gly Asp Tyr
Leu Cys Ser Leu Asn Asp His Leu Val Gly

Thr Val Pro Leu Leu Val Asp Val Pro Pro
Glu Glu Pro Lys Leu Ser Cys Phe Arg Lys
Asn Pro Leu Val Asn Ala Ile Cys Glu Trp
Arg Pro Ser Ser Thr Pro Ser Pro Thr Thr
Lys Ala Val Leu Phe Ala Lys Lys Ile Asn
Thr Thr Asn Gly Lys Ser Asp Phe Gln Val
Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Gln Leu Lys Ser
Phe Ser Cys Gln Val Glu Ile Leu Glu Gly
Asp Lys Val Tyr His Ile Val Ser Leu Cys
Val Ala Asn Ser Val Gly Ser Lys Ser Ser
His Asn Glu Ala Phe His Ser Leu Lys Met
Val Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Leu Val
Val Ser Ala Ile Pro Gly Arg Pro Arg Trp
Leu Lys Val Ser Trp Gln His Pro Glu Thr
Trp Asp Pro Ser Tyr Tyr Leu Leu Gln Phe
Gln Leu Arg Tyr Arg Pro Val Trp Ser Lys
Glu Phe Thr Val Leu Leu Leu Pro Val Ala
Gln Tyr Gln Cys Val Ile His Asp Ala Leu
Arg Gly Val Lys His Val Val Gln Val Arg
Gly Lys Glu Glu Leu Asp Leu Gly Gln Trp

Ser Glu Trp Ser Pro Glu Val Thr Gly Thr
Pro Trp Ile Ala Glu Pro Arg Thr Thr Pro
Ala Gly Ile Leu Trp Asn Pro Thr Gln Val
Ser Val Glu Asp Ser Ala Asn His Glu Asp
Gln Tyr Glu Ser Ser Thr Glu Ala Thr Ser
Val Leu Ala Pro Val Gln Glu Ser Ser Ser
Met Ser Leu Pro Thr Phe Leu Val Ala Gly
Gly Ser Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Cys
Val Phe Ile Ile Leu Arg Leu Lys Gln Lys
Trp Lys Ser Glu Ala Glu Lys Glu Ser Lys
Thr Thr Ser Pro Pro Pro Pro Tyr Ser
Leu Gly Pro Leu Lys Pro Thr Phe Leu Leu
Val Pro Leu Leu Thr Pro His Ser Ser Gly
Ser Asp Asn Thr Val Asn His Ser Cys Leu
Gly Val Arg Asp Ala Gln Ser Pro Tyr Asp
Asn Ser Asn Arg Asp Tyr Leu Phe Pro Arg

(C 末端)

(ただし、式中 Ala はアラニン、Arg はアルギニン、Asn はアスパラギン、Asp はアスパラギン酸、Cys はシステイン、Gln はグルタミン、Glu はグ

ルタミン酸、Gly はグリシン、His はヒスチジン、Ile はイソロイシン、Leu はロイシン、Lys はリジン、Met はメチオニン、Phe はフェニルアラニン、Pro はプロリン、Ser はセリン、Thr はトレオニン、Trp はトリプトファン、Tyr はチロシン、そしてVal はバリン残基を示す。)で表されるアミノ酸配列を有するものである。本発明では前記アミノ酸配列を有する蛋白質の他、前記アミノ酸配列中のI L-6との特異的な結合に寄与する部分を含有する蛋白質またはポリペプチドであれば良い。すなわち前記アミノ酸配列中の1個または複数個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基により置換されているかまたは欠失もしくは付加されているアミノ酸配列を有し、かつマウスI L-6と特異的に結合する能力を保持している蛋白質またはポリペプチドはすべて本発明のマウスI L-6レセプターの範囲に含まれる。例えば、このような蛋白質として、前記アミノ酸配列中のI L-6との結合に寄与するアミノ酸配列および/またはアミノ酸残基部分以外のアミノ酸配列および/ま

たはアミノ酸残基が置換、欠損、挿入等により変化したもの、さらには前記アミノ酸配列のN末端側および/またはC末端側にアミノ酸配列および/またはアミノ酸残基が追加された蛋白質、あるいは例えばヒト成長ホルモン等の他の蛋白質等が融合したものであっても良い。

式(1)で示されるアミノ酸配列は460アミノ酸残基からなり、N末端側から第2番目に位置するロイシンから第19番目に位置するアラニンにかけて、第358番目に位置するセリンから第385番目に位置するロイシンにかけての部分に疎水性アミノ酸残基が位置している、この2つの疎水性領域は、前者がシグナルペプチド領域、後者が膜貫通領域であると考えられる。

2. DNA配列

生体内で産生されるマウスI L-6レセプターをコードするDNA配列は、詳しくは次の式(II)により示される。

(5-)

```

ATG CTG ACC GTC GGC TGC ACG CTG TTG GTC
GCC CTG CTG GCC GCG CCC GCG GTC GCG CTG
GTC CTC GGG AGC TGC CGC GCG CTG GAG GTG
GCA AAT GGC ACA GTG ACA AGC CTG CCA GGG
GCC ACC GTT ACC CTG ATT TGC CCC GGG AAG
GAA GCA GCA GGC AAT GTT ACC ATT CAC TGG
GTG TAC TCT GGC TCA CAA AAC AGA GAA TGG
ACT ACC ACA GGA AAC ACA CTG GTT CTG AGG
GAC GTG CAG CTC AGC GAC ACT GGG GAC TAT
TTA TGC TCC CTG AAT GAT CAC CTG GTG GGG
ACT GTG CCC TTG CTG GTG GAT GTT CCC CCA
GAG GAG CCC AAG CTC TCC TGC TTC CGG AAG
AAC CCC CTT GTC AAC GCC ATC TGT GAG TGG
CGT CCG AGC AGC ACC CCC TCT CCA ACC ACG
AAG GCT GTG CTG TTT GCA AAG AAA ATC AAC
ACC ACC AAC GGG AAG AGT GAC TTC CAG GTG
CCC TGC CAG TAT TCT CAG CAG CTG AAA AGC
TTC TCC TGC CAG GTG GAG ATC CTG GAG GGT
GAC AAA GTA TAC CAC ATA GTG TCA CTG TGC

```

```

GTT GCA AAC AGT GTG GGA AGC AAG TCC AGC
CAC AAC GAA GCG TTT CAC AGC TTA AAA ATG
GTG CAG CCG GAT CCA CCT GCC AAC CTT GTG
GTA TCA GCC ATA CCT GGA AGG CCG CGC TGG
CTC AAA GTC AGC TGG CAG CAC CCT GAG ACC
TGG GAC CCG AGT TAC TAC TTG CTG CAG TTC
CAG CTT CGA TAC CGA CCT GTA TGG TCA AAG
GAG TTC ACG GTG TTG CTG CTC CCG GTG GCC
CAG TAC CAA TGC GTC ATC CAT GAT GCC TTG
CGA GGA GTG AAG CAC GTG GTC CAG GTC CGT
GGG AAG GAG GAG CTT GAC CTT GGC CAG TGG
AGT GAA TGG TCC CCA GAG GTC ACG GGC ACT
CCT TGG ATA GCA GAG CCC AGG ACC ACC CCG
GCA GGA ATC CTC TGG AAC CCC ACA CAG GTC
TCT GTT GAA GAC TCT GCC AAC CAC GAG GAT
CAG TAC GAA AGT TCT ACA GAA GCA ACG AGT
GTC CTC GCC CCA GTG CAA GAA TCC TCG TCC
ATG TCC CTG CCC ACA TTC CTG GTA GCT GGA
GGA AGC TTG GCG TTT GGG TTG CTT CTC TGT
GTC TTC ATC ATC CTG AGA CTC AAG CAG AAA

```

TGG AAG TCA GAG GCT GAG AAG GAA AGC AAG
 ACG ACC TCT CCT CCA CCC CCA CCG TAT TCC
 TTG GGC CCA CTG AAG CCG ACC TTC CTT CTG
 GTT CCT CTC CTC ACC CCA CAC AGC TCT GGG
 TCT GAC AAT ACC GTA AAC CAC AGC TGC CTG
 GGT GTC AGG GAC GCA CAG AGC CCT TAT GAC
 AAC AGC AAC AGA GAC TAC TTA TTC CCC AGA

(3-)

で表されるDNA配列を有するものである。本発明のDNA配列は、式(II)のDNA配列の他、このDNA配列中の1個または複数個のヌクレオシドが他のヌクレオシドにより置換されているかまたは欠失もしくは付加されているDNA配列を有し、かつマウスIL-6と特異的に結合する能力を有する蛋白質をコードしているDNA配列をも含有する。例えば、前記1において記載した種々のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA配列があげられる。

これらのDNA配列は、例えばBALB/c等のマウスの例えば脾臓細胞から、公知な方法で抽出し

た種々のメッセンジャーRNAより、本発明により提供される式(II)DNA配列をもとに作製したプローブ等を用いて目的とするメッセンジャーRNAを抽出し、これをもとに作製しても良いし、また例えば一部あるいは全部を本発明をもとに化学的に合成しても良い。

3. 発現ベクター

本発明で提供されるIL-6レセプターをコードするDNA配列を発現、すなわち生産し得る複製可能な発現ベクターは、前記2で説明されたようなDNA配列を発現させ得るDNA配列と読取り可能に結合しているマウスIL-6レセプターをコードするDNA配列および宿主中でベクターDNAを複製するための複製オリジン等を有し、選定した宿主を形質転換できるものであれば制限なく適宜選定して使用できる。例えば宿主として大腸菌等の細菌株を用いる場合は、pBR322、pBR327等のプラスミドが例示できる。また例えば、宿主として哺乳動物等の培養細胞を用いる場合には、SV40ウイルス由来のDNA複製オリジン等を有する

ベクターが例示できる。

DNA配列を発現させるためのDNA配列の中でも、プロモーター系は重要であり、しかも選定した宿主との関係において適宜選定する必要がある。宿主として大腸菌を使用する場合のプロモーター系としては、乳糖プロモーター系、トリプトファンプロモーター系、さらにはこれらのハイブリッドプロモーター系が例示できる。宿主として哺乳動物由来の培養細胞を使用する場合のプロモーター系としては、SV40プロモーター系、アデノウイルスプロモーター系が例示できる。

4. 宿主

本発明では、特別の制限なしに通常の遺伝子工学的に蛋白質を生産するために用いられる微生物または培養細胞が使用できる。微生物としては、K-12、W-3110等の大腸菌類、枯草菌類、酵母等を例示できる。培養細胞としては、COS細胞(猿の腎臓繊維芽細胞)、CHO細胞(チャイニーズハムスターの卵母細胞)等が例示できる。

5. 形質転換された宿主を用いたマウスIL-6

レセプターの生産

前記3で説明したベクターにより形質転換された前記4で説明された様な宿主を培養し、ベクターDNA中のマウスIL-6レセプターをコードするDNA配列を発現させることでマウスIL-6レセプターを生産することができる。これはマウスIL-6レセプターをコードするDNA配列と結合した該DNA配列を発現させ得るDNA配列中のプロモーター系の活性化により実現される。

〔実施例〕

以下本発明をさらに詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1. マウスIL-6レセプターcDNAの単離

一連の遺伝子組み換え操作方法(m-RNAの抽出、DNAの制限酵素による切断等)は、マニアティスらの方法(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory 1982年参照)、ハーウィンらの方法(DNAcloning, a Practical Approach vol.

1, p49, IRL, Oxford, 1985 年参照) を参照に行った。

まず、マウス・ミエローマ細胞株P3U1 (AT CC CRL 1957) からmRNAを抽出し、ラムダファージgt10 (アマーシャム) を用いてcDNAライブラリーを作製した。次にpBSF2R, 236 (K. Yamasakiら、Science, 241, p825, 1988年参照) のインサートcDNAのFspI-BanI 断片をプローブとして用い、 7.3×10^5 クローンを以下の条件でスクリーニングした。ブランクをプロットするフィルターにはナイロンフィルターであるジーンスクリーンプラス(NEN社)を用いた、ハイブリダイゼーションは、1% SDS, 1M NaCl, 0.05M Tris HCl (pH 7.5)・5×デンハルト溶液、200μl/mlサケ精子DNA存在下で、65℃にて16時間行った。その後、2×SSC, 1% SDSで、60℃にてフィルターを洗って非特異的にフィルターに結合したプローブを分離させ、乾燥後、オートラジオグラフィを行った。

なお、前記プラスミドpBSF2R, 236を制限酵素

Xho Iで部分消化し、BSF 2レセプターをコードする塩基配列をすべて含有するDNA断片を得、これを市販のベクター pIB176 (IBI社) のSal I部位に挿入してプラスミドpIB1BSF2Rを作製した。このプラスミドpIB1BSF2Rを含有する大腸菌HB101-pIB1BSF2Rは、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研条寄第2232号(FERM BP-2232)として寄託されている。このプラスミドから、常法に従って適当な制限酵素によりBSF 2レセプター蛋白質をコードするDNA断片を切り出し、本発明で用いるプローブを作製することができる。

このようにして単離された1つのクローンをラムダP1 (lambda P1) と名付けた、第1図にラムダP1の制限酵素地図および対応するIL-6レセプター蛋白質の模式図を示す。しかしながら、ラムダP1のインサートcDNAの塩基配列を決定した結果、ヒトIL-6レセプターとの比較より、完全長のマウスIL-6レセプターがコードされていないことが判明した。

そこで、完全長のマウスIL-6レセプター

cDNAを単離する目的で、上記方法でBALB/cの脾臓からmRNAを抽出し、gt10を用いてcDNAライブラリーを作製した。プローブとして図1のプローブを用い、通常の方法でスクリーニングした結果、1つのクローン、ラムダ301 (lambda 301) を単離した、ラムダ301のインサートcDNAの塩基配列を決定した結果、ヒトIL-6レセプターとの比較より、完全長のマウスIL-6レセプターがコードされていることが判明した。ヒトIL-6レセプターとマウスIL-6レセプターの相同性は、DNAレベルで69%、アミノ酸レベルで54%であった。

またラムダP1とラムダ301のそれぞれコードするマウスIL-6レセプターcDNA塩基配列を比較したところ、第1番目のメチオニンから第385番目のロイシンまでをコードするDNA配列は一致したが、それ以降のアミノ酸をコードするDNA配列は全く異なっていた。さらに詳細な塩基配列の解析を行ったところ、ラムダP1の第386番目以降のアミノ酸をコードするDNA配列は、

intracisternal A-particle(IAP)遺伝子由来であることが判明した。

第1図に、ラムダ301の制限酵素地図および対応するIL-6レセプター蛋白質の模式図を示す。第2図に、ラムダ301のインサートcDNAの塩基配列および塩基配列から推定されるマウスIL-6レセプターのアミノ酸配列を示す。

実施例2. マウスIL-6レセプター遺伝子導入によるマウスIL-6レセプター蛋白質の発現

田賀らにより、ヒトIL-6レセプターの細胞外領域が、IL-6との結合およびシグナルの伝達に必須で、細胞内領域はこれらの目的には不要であることが示された(Cell, 58, p573, 1989年参照)。

単離したラムダ301のインサートcDNAが、マウスIL-6レセプターのcDNAであること、および、マウスIL-6レセプター蛋白質の細胞外領域のみがIL-6との結合およびシグナルの伝達に必須であることを示す目的で、ラムダP1のインサ

ートcDNA (細胞外領域をコードするDNAはラムダ301と一致するが、膜貫通領域および細胞内領域はラムダ301と異なる。)、あるいはラムダ301のインサートcDNAを細胞に導入し、マウスIL-6レセプターを細胞膜上に発現させ、IL-6によるシグナル伝達を調べた。

まず、アミノ酸コード領域を完全に含むラムダP1のEcoRI-EcoRI断片、およびラムダ301のEcoRI-KpnI断片をそれぞれ、ネオマイシン耐性遺伝子を含む動物細胞発現ベクター、pM5G(C. Lakerら、Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A., 84, p8459, 1987年参照)に組み込んだ。次に、10%牛血清、50 units/mlペニシリン、50 μ g/mlストレプトマイシン、2mMグルタミン、50mM 2-メルカプトエタノール、10units/mlヒトIL-6を含むRPMI 1640培地で培養したヒトIL-6依存性ヒトT細胞株、KT-3 (S. Shimizuら、Blood 72, p1826, 1988年参照)に、通常のエレクトロポレーション法で、作製したベクターをそれぞれ導入した。750 μ g/mlのG418 (シグマ社)を含む上記組成の

培地でスクリーニングを行い、最終的に、2種類の形質転換細胞を得た。

この形質転換細胞 2.5×10^3 を種々の濃度のマウス・リコンビナントIL-6あるいは6ng/mlのヒト・リコンビナントIL-6存在下で66時間培養した。最後の6時間は、0.5 μ Ciのトリチウム標識チミジンでパルスし、細胞への取り込みをシンチレーションカウンター (ベックマン社)で測定した。

第3図から明らかなように、ラムダP1由来のマウスIL-6レセプターが発現している細胞、および、ラムダ301由来のマウスIL-6レセプターが発現している細胞はマウス・リコンビナントIL-6に濃度依存的に増殖する。一方、形質転換されていないKT-3は、マウス・リコンビナントIL-6に反応しない。また、3種類の細胞ともヒト・リコンビナントIL-6には反応する。これらの事実は、ラムダ301のインサートDNAはマウスIL-6レセプターのcDNAであることを証明するものであり、マウスIL-6レセ

プターはヒトIL-6レセプターと同様に、細胞外領域がIL-6との結合およびシグナルの伝達に重要であり、細胞内領域は他の配列に置き換えられることを示す。

〔発明の効果〕

本発明で提供されるマウスIL-6レセプターをコードするDNA配列は、さらには該蛋白質を遺伝子工学的に生産するための手段および方法により、自然状態では極めて微量にしか生産されない該蛋白質を大量に生産することが可能である。また本発明により、マウスIL-6レセプターの生体内での諸性質を解析および推定することが可能である。このことはIL-6レセプターさらには生体の免疫機構等の研究、またはそれらを用いた免疫疾患に対する治療薬診断薬等の開発等に大きな意義をもつものである。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、ラムダP1およびラムダ301の制限酵素地図および対応するIL-6レセプター蛋白

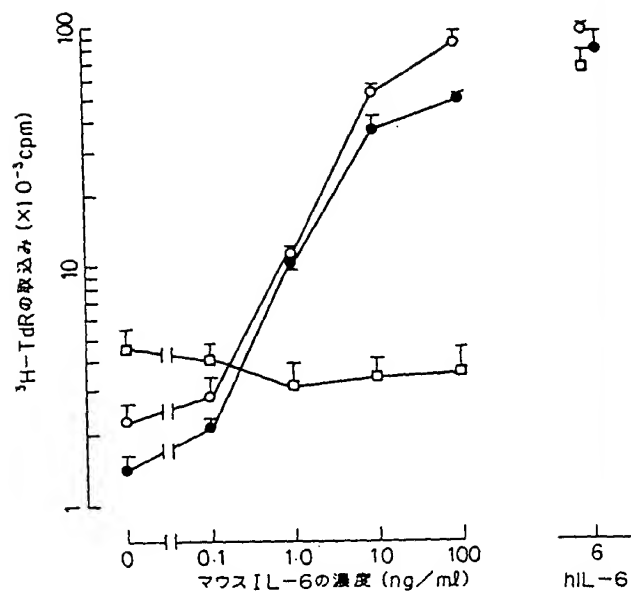
質の模式図、さらにはプローブ1の位置を示す。BはBamHIサイト、EはEcoRIサイト、FはFokIサイト、HはHindIIIサイト、KはKpnIサイト、PはPstIサイト、SはSmaIサイトをそれぞれ示す。また、SSはシグナル配列、ECは細胞外領域、TMは膜貫通領域、Cは細胞内領域を示す。

第2図は、ラムダ301のインサートcDNA、すなわちマウスIL-6レセプターをコードするDNA配列についてその塩基配列を解析した結果、およびこのDNA配列が発現された場合に生産される蛋白質すなわちマウスIL-6レセプターの推定されるアミノ酸配列を示す。下線部分はN末端側の疎水性アミノ酸領域を示し、二重下線部分はC末端側の疎水性アミノ酸領域を示す。

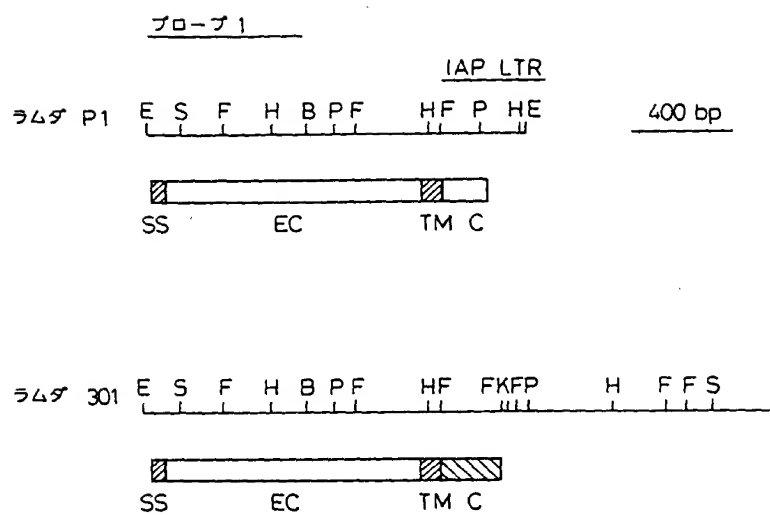
第3図は、ラムダP1由来のマウスIL-6レセプター発現KT-3 (○)、ラムダ301由来マウスIL-6レセプター発現KT-3 (●)、正常のKT-3 (□)の、種々の濃度のマウス・リコンビナントIL-6存在下でのトリチウム標識

チミジンの取り を示す。

特許出願人
岸 本 忠 三
特許出願代理人
弁理士 青 木 朗
弁理士 石 田 敬
弁理士 福 本 廣
弁理士 山 口 昭 之
弁理士 西 山 雅 也



第 3 図



第 1 図

